Nicht im Buchhandel.

Abdruck

aus dem

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

Erste Abteilung:

Mediz.-hygien. Bakteriologie u. tier. Parasitenkunde.

Originale

In Verbindung mit

Geh. Med.-Rat Prof. Dr. Loeffler, Prof. Dr. R. Pfeiffer, Prof. Dr. M. Braun

Greifswald Königsberg i. Pr.

herausgegeben von

Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3.

XLI. Band. 1906.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Abdruck aus dem
entralblatt f. Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten.
I. Abteilung. Originale.
erausgeg. von Prof. Dr. O. Uhlworm in Berlin. — Verlag von Gust. Fischer in Jena.
XLI. Bd. 1906. Heft 2.

Ueber die Eigenschaften eines von Ziegen gewonnenen Antityphusserums.

Von **Allan Macfadyen,**
Lister Institute of Preventive Medicine London.

In dieser Mitteilung habe ich die Absicht, einen kurzen Bericht über die Resultate zu geben, welche ich durch Immunisierung der Ziege mit den Zellsäften der Typhusbacillen erhalten habe. Die Experimente sind eine Fortsetzung der früher veröffentlichten, deren Hauptziel es war einen Antikörper gegen das Typhusendotoxin zu gewinnen (1). Bei anderer Gelegenheit werde ich über die Versuche berichten, welche mich zu der jetzt beschriebenen Immunisierungsmethode geführt haben und auch über die soweit überstandenen Schwierigkeiten, welche den Fortschritt meiner Untersuchungen verzögert haben.

Es wird augenblicklich genügend sein, wenn ich sage, daß zur Lösung der theoretischen und praktischen Fragen, die mir entgegengetreten sind die Ziege sich als ein viel geeigneteres Tier als das Pferd erwiesen hat Es war viel leichter, die Methode, die ich später auf das Pferd übertragen will, zuerst an der Ziege gründlich auszuarbeiten. Die Versuche sind jetzt so weit vorgeschritten, um einen Bericht darüber geben zu können. Der Zweck der Versuche war also folgender:

Wie kann man am besten durch Benutzung der Zellsäfte des Typhusbacillus einen Antikörper für das schon demonstrierte Typhusendotoxin erzeugen, und eine befriedigende Steigerung des antitoxischen Wertes des Serum erreichen.

Im Laufe meiner Versuche sind von Dr. Besredka zwei Arbeiten erschienen über einen Antikörper für das Typhusendotoxin (2). Diese werde ich zuerst kurz erwähnen.

Besredka hat nämlich ein Pferd mit toten und lebenden Typhusbacillen intravenös injiziert. Die am Pferde gemachten Injektionen erstreckten sich über 2 Jahre. — Das Pferdeserum wurde auf seinen antitoxischen Wert geprüft gegen 1) getötete und getrocknete Typhuskulturen, wovon 0,01 g Merrschweinchen intraperitoneal tötete, 2) ein lösliches Endotoxin von den trockenen Bacillen extrahiert, wovon $^1/_8$ ccm tödlich war. Die Hauptresultate waren folgende: 10 cg trockenes Serum (ungefähr 1 ccm) neutralisierte 10 Dosen der toten Bacillen und 16 Dosen des löslichen Endotoxins auf Meerschweinchen geprüft.

Diesen niedrigen Wert hat Besredka nach 2 Jahre langer Behandlung des Pferdes mit Typhuskulturen erhalten. Ich werde nochmals auf seine Resultate zurückkommen.

Die Zellsäfte, die ich für meine Versuche benutzt habe, wurden in folgender Weise präpariert. Die virulenten Typhusbacillen direkt von der Bauchhöhle des Meerschweinchens isoliert, wurden auf Nähragar in Roux-Flaschen 18 Stunden lang bei Bruttemperatur gezüchtet. Die Kulturen wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen, und $^1/_2$ Stunde lang zentrifugiert. Die Bacillen wurden danach bei der Temperatur von flüssiger Luft in dem schon beschriebenen Apparat zerkleinert, ungefähr $^1/_2$ Stunde pro Gramm Bacillen. Das Produkt wurde in 1 pro Mille Kalilaugelösung aufgenommen und während 2 Stunden zentrifugiert. In dieser Weise bekam man einen 10-proz. Extrakt von Typhuszellsaft

ınd als Beimengung solche Bacillen, die nicht durch das 2 Stunden lange ;entrifugieren entfernt wurden. Die Flüssigkeit wurde $1/2$ Stunde mit Chloroformdampf behandelt. Die so erhaltenen Zellsäfte waren steril ınd für die Versuchstiere, nämlich Ziegen und Kaninchen, akut toxisch ntravenös.

Die nach dieser Methode gewonnenen Endotoxine sind labile Körper ınd die Zellsäfte verlieren rasch ihre ursprüngliche Giftigkeit. Die auf-)ewahrten Zellsäfte haben geringe oder gar keine toxische Wirkung.

Die Versuche, welche ich mit diesen Säften zuerst gemacht habe, iberzeugten mich, daß man in dieser Weise wenig Toleranz in den /ersuchstieren gegen vollgiftige Säfte erzeugen würde. Die Wahrschein-ichkeiten waren gegen diese leichtere und weniger gefährliche Immuni-ierungsmethode.

Ich habe deshalb in meinen späteren Versuchen nur frische, akut-oxische Zellsäfte benutzt. Die Säfte enthielten durchschnittlich 10 bis 2 mg feste Bestandteile pro Kubikcentimeter.

Die frischen Säfte wirkten auf Ziegen intravenös akut toxisch. Die rste Ziege starb nach Einspritzung von 1 ccm; $1/10$ ccm war auch akut oxisch und 2 Ziegen starben nach Einspritzung von $1/20$ ccm binnen 2 Stunden. Die Tiere wurden ohnmächtig mit heftiger Diarrhöe. ındere Ziegen bekamen nach Injektion von $1/20$ ccm akut Diarrhöe, und $/30$ ccm genügte schon, die Tiere krank zu machen.

Es war deshalb klar, daß die intravenösen Injektionen der toxischen ;ellsäfte sehr vorsichtig ausgeführt sein mußten, um die Tiere nicht zu ehr anzugreifen oder zu töten. Eine Ziege starb nach Einspritzung on $1/20$ und $1/10$ ccm; eine andere Ziege nach Injektion von $1/20$, $1/10$, $/2$ und 1 ccm binnen 4 Stunden. Diese Erfahrungen haben mich gelehrt, nit kleineren Dosen anzufangen und sie sehr allmählich nach genügen-len Intervallen zu steigern — eine Injektion wöchentlich war genügend.

Es war auch zweckmäßig, dieselbe Dosis zu wiederholen, bis sie icht mehr toxisch wirkte, ehe man sie steigerte. Die Methode hat ich bis jetzt bewährt, denn nur durch sie ist es gelungen, die Tiere n sonst tödliche Dosen des Endotoxins gewöhnen zu können.

In dem hier beschriebenen Versuche wurde die antiendotoxische Virkung des Serums auf Kaninchen probiert. Das Endotoxin tötete ¦aninchen intravenös in akuter Weise, z. B. $1/10$ ccm nach heftiger)iarrhöe, manchmal in 2 Stunden; auch $1/20$ ccm war ebenfalls eine ötliche Dosis. Nach Einspritzung waren die Kaninchen gewöhnlich innen einer Stunde krank. Die Bedingungen waren deshalb genügend treng, um irgend eine antiendotoxische Wirkung zu konstatieren. Die 'oxicität der Zellsäfte war bei jedem Versuch festgestellt.

Ich habe mich zuerst überzeugt, daß weder normales Ziegen- oder ¦aninchenserum irgend eine bemerkbare antitoxische Wirkung besaß.)as Serum der behandelten Ziegen wurde auch für Agglutinine und ınd Bakteriolysine geprüft.

Ich werde nun meinen ersten gelungenen Versuch mitteilen.

Ziege I.

Bekam intravenös jeden 7. Tag folgende Mengen der toxischen Zell-äfte des B. typhosus:

$1/20$ ccm: Tier krank, $1/10$ ccm: krank, $1/5$ ccm: krank, $1/2$ ccm: krank, ccm: krank, 1 ccm: krank, 1 ccm: wohl, 1,5 ccm: wohl, 1,5 ccm: wohl, ccm: krank, 2 ccm: krank, 2,5 ccm: Tier tot.

Nach diesem Versuch war es klar, daß andere Tiere noch voı sichtiger und mit noch geringeren Dosen behandelt werden mußten.

Die Serumprüfungen der Ziege I sind in Tabelle II gegeben. I allen Proben wurde das Gemisch von Serum und Gift vor Einspritzun $^1/_2$ Stunde bei 37° C gehalten.

I.
Normalserum der Ziege.

Kaninchen I:	3 ccm Serum +	1 ccm Endotoxin	†
„ II:	2 „ „ +	1 „ „	†
„ III:	Kontrolle	$^1/_{10}$ „ „	†
„ IV:	„	$^1/_{20}$ „ „	Diarrhöe.

3 ccm des normalen Ziegenserums hat also 1 ccm eines toxische Zellsaftes nicht neutralisiert, wovon $^1/_{10}$ ccm tödlich war und $^1/_{20}$ ccı toxisch wirkte.

II.
Serumprüfung der Ziege I.

Datum	Kaninchen	Serum + Endotoxin	Bemerkungen
23. Juni 1905	1	3 ccm Serum + 1 ccm Endotoxin	lebt
	2	Kontrolle 1 „ „	tot
7. Juli 1905	1	3 ccm Serum + 2 „ „	lebt
	2	3 „ „ + 1 „ „	„
	3	2 „ „ + 1 „ „	„
	4	Kontrolle 2 „ „	tot nach 4 Std.
	5	„ $^1/_{20}$ „ „	„ „ 18 „
14. Juli 1905	1	3 ccm Serum + 2 „ „	lebt
	2	2 „ „ + 2 „ „	„
	3	1 „ „ + 1 „ „	„
	4	$^1/_{10}$ „ „ + 1 „ „	„
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	tot
	6	„ $^1/_{20}$ „ „	akut Diarrhöe
21. Juli 1905	1	1 ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_2$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{10}$ „ „ + 1 „ „	„
	4	Kontrolle 1 „ „	tot
	5	„ $^1/_{10}$ „ „	akut Diarrhöe
	6	„ $^1/_{15}$ „ „	„ „
4. Aug. 1905	1	$^1/_{20}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	„ tödliche Dos nicht vermittelt
11. Aug. 1905	1	$^1/_{20}$ „ „ + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	tot
	4	Kontrolle 1 „ „	„ nach 4 Std.
	5	„ $^3/_{10}$ „ „	„ „ 18 „
	6	„ $^1/_{10}$ „ „	„ „ 18 „

Die Tabelle zeigt, daß im Laufe der Behandlung Antikörper für da Endotoxin erzeugt und daß die Resultate ermutigend waren. Nac 12 Einspritzungen des Typhuszellsaftes war $^1/_{50}$ ccm des Ziegenserun im stande, 10 tödliche Giftdosen zu neutralisieren. Diese Fähigkeit wa nicht in 3 ccm Normalserum vorhanden. Es war deshalb gelungeı nicht nur eine antiendotoxische Wirkung zu konstatieren, sondern de Wert des Serums bedeutend zu erhöhen. Es war eine bemerkbaı Steigerung des Immunisierungswertes des Serums erzielt.

In dieser Mitteilung beabsichtige ich nicht auf die agglutinierenden und bakteriolytischen Eigenschaften des Serums einzugehen. Agglutinine waren in schwankender Menge vorhanden. — Der höchste Titer war bei $^1/_{1\,000\,000}$ Verdünnung des Serums erreicht. Was Bakteriolysine betrifft, schützte nach 12 Einspritzungen des Zellsaftes $^1/_{10\,000}$ ccm des Serums Meerschweinchen intraperitonal gegen 10 tödliche Dosen der Typhusbacillen.

Das Serum der Ziege I besaß also bestimmte antiendotoxische, agglutinierende und bakteriolytische Eigenschaften. Hiernach habe ich an frischen Ziegen diese Resultate kontrolliert und die Behandlung noch vorsichtiger ausgeführt.

Die adoptierte Methode wird durch folgende Tabelle klar.

Ziege II.

Bekam intravenös jeden siebenten Tag folgende Mengen des toxischen Zellsaftes des B. typhosus:

$^1/_{20}$ ccm: Tier krank, $^1/_{20}$ ccm: wohl, $^1/_{15}$ ccm: krank, $^1/_{15}$ ccm: wohl, $^1/_{10}$ ccm: wohl, $^1/_{10}$ ccm: krank, $^1/_{10}$ ccm: krank, $^1/_{10}$ ccm: wohl, $^1/_8$ ccm: krank, $^1/_8$ ccm: wohl, $^1/_8$ ccm: wohl, $^1/_6$ ccm: krank, $^1/_3$ ccm: wohl, $^1/_6$ ccm: wohl, $^1/_4$ ccm: wohl, $^1/_4$ ccm: wohl, $^1/_3$ ccm: krank, $^1/_3$ ccm: wohl.

Drei Ziegen sind in Behandlung bei dieser Methode von geringer und sanfter Dosierung, und keine ist bis jetzt gestorben.

Das Serum der Ziege II war gleichfalls auf antiendotoxische Wirkung probiert. Die Resultate sind aus Tabelle III ersichtlich. Während die Menge des Zellsaftes in Ziege I injiziert von $^1/_{20}$ bis $2^1/_2$ ccm erhöht wurde, betrug die Menge am Ende der jetzigen Proben in Ziege II injiziert nur $^1/_3$ ccm Zellsäfte, 10—12 mg feste Substanz enthaltend.

III.
Serumprüfung der Ziege II.

Datum	Kaninchen	Serum + Endotoxin	Bemerkungen
29. Dez. 1905	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 ccm Endotoxin	lebt
	2	$^1/_{20}$ „ „ + 1 „ „	tot
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	lebt
	4	Kontrolle $^1/_5$ „ „	tot nach 2 Std.
	5	„ $^1/_{10}$ „ „	akut Diarrhöe
19. Jan. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	tot
	3	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	„
26. Jan. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	tot
	3	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	„
2. Febr. 1906	1	$^1/_{10}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{20}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	4	$^1/_{50}$ „ „ + $^1/_2$ „ „	„
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	tot nach $2^1/_2$ Std.
	6	„ $^1/_{20}$ „ „	„ „ 2 „
	7	„ $^1/_{30}$ „ „	„ „ 18 „
9. Febr. 1906	1	$^1/_{50}$ ccm Serum + 1 „ „	lebt
	2	$^1/_{50}$ „ „ + 1 „ „	„
	3	$^1/_{100}$ „ „ + 1 „ „	tot
	4	$^1/_{100}$ „ „ + $^1/_2$ „ „	lebt
	5	Kontrolle $^1/_{10}$ „ „	tot
	6	„ $^1/_{20}$ „ „	akut Diarrhöe.

Die Tabelle demonstriert nochmals das Erzeugen in deutliche Menge eines Antiendotoxins. Der antiendotoxische Wert war so wei erhöht, daß schon $1/_{50}$ ccm Serum der Ziege II genügte, um ein Kanin chen gegen 30 tödliche Dosen des Giftes zu schützen.

Trotz Injizieren relativ kleinerer Mengen des Zellsaftes als in Ziege waren die Resultate, was antiendotoxische Wirkung betrifft, äquivalent und eine deutliche Steigerung der Immunität nachweisbar. Diese Steige rung hervorzubringen, war das schwierigste Problem, das ich zu löse hatte und es ist mir so weit gelungen.

In folgenden Versuchen wurden Serum und Gift simultan, aber ge trennt injiziert.

Kaninchen I: Erhielt 15 tödliche Dosen Typhuszellsaft in di rechte und 1 ccm Serum in die linke Ohrvene. 20 Minuten späte wurde noch 1 ccm Serum injiziert. Das Tier lebte.

Kaninchen II: 5 tödliche Dosen Endotoxin in die rechte un 1 ccm Serum in die linke Ohrvene. Das Tier lebte.

Kaninchen III: 5 tödliche Dosen in die Ohrvene und $3/_4$ Stund später am Anfang der toxischen Symptome 2 ccm Serum. Das Tier lebte

Dit antiendotoxische Wirkung war also auch unter diesen Bedingunge gelungen.

Das Agglutinintitrat des Serums war im Laufe der Immunisierun auch schwankend. Der höchste Titer war bei $1/_{1\,000\,000}$ Serumverdünnun nachweisbar.

$1/_{10\,000}$ ccm des Serums schützte Meerschweinchen gegen 10 tödlich Dosen Typhusbacillen.

Das Serum war auch gegen das Choleraendotoxin in folgender Weis probiert: $1/_2$ ccm Typhusserum wurde mit drei tödlichen Dosen Cholera endotoxin gemischt und nach $1/_2$ Stunde bei 37° C dem Kaninche intravenös injiziert. Das Kaninchen starb $2^1/_2$ Stunde nach der Injektion Dadurch war bewiesen, das $1/_2$ ccm von Typhusserum, wovon $1/_{50}$ ccm gegen 30 Dosen des Typhusendotoxins schützte, nicht fähig war gege drei tödliche Dosen Choleraendotoxin zu schützen. Insoweit war da Serum spezifisch.

Das Serum der Ziege II wurde für Präzipitinreaktionen gegen de frischen Typhuszellsaft geprüft. Das Resultat war negativ in Ver dünnungen von 1:10, 1:100 und 1:500. — Es waren keine bemerkbare Präzipitine im Blut vorhanden, trotz der deutlichen antitoxischen Wir kung des Serums.

Schlußfolgerungen.

1) Durch intravenöse Behandlung der Ziege mit toxischen Zellsäfte der Typhusbacillen (in der beschriebenen Weise gewonnen) in kleine und sehr vorsichtig regulierten Mengen, ist es möglich geworden, ei Antiendotoxin zu gewinnen.

2) In dieser Weise ist es auch möglich geworden, eine prägnant Steigerung des antitoxischen Wertes des Serums zu erzielen — inde $1/_{50}$ ccm 30 tödliche Dosen des toxischen Zellsaftes neutralisierte — ein Eigenschaft, die nicht in 3 ccm normalem Ziegenserum vorhanden ist

3) Nach weniger als 4 Monate langer Behandlung der Ziege wurde diese Resultate schon erzielt. Sie sind nach einer rascheren Immuni sierungsmethode unweit besser als die von Besredka mit tote und lebenden Bacillen erhaltenen, nach 2 Jahre langer Behandlung eine Pferdes.

4) Wirksam war auch das Serum gegen das Endotoxin, als beide multan aber getrennt injiziert waren.

5) Das Serum wirkte agglutinierend auf Typhusbacillen in einer erdünnung von $^{1}/_{1\,000\,000}$ ccm.

6) Das Serum war auch bakteriolytisch, $^{1}/_{10\,000}$ ccm schützte gegen) tödliche Dosen des Typhusbacillus.

7) Das Serum hatte keine nachweisbare Präzipitinwirkung auf frische ıd toxische Typhuszellsäfte.

8) Das Typhusserum schützte nicht gegen drei tödliche Dosen des ıoleraendotoxins und war in dem Maße spezifisch.

Es soll nun meine nächste Aufgabe sein zu versuchen, inwieweit möglich ist, analoge Resultate beim Pferde zu erzielen.

Ich habe auch positive Resultate mit Choleraendotoxin an der Ziege halten, und werde bald ausführlich darüber berichten.

Ich bin Herrn E. T. Thompson für seine große Hilfe sehr verlichtet, ebenso für eine Verbesserung am Apparat, wodurch der Zereinerungsprozeß ganz ungefährlich geworden ist.

Referate.

Macfadyen, Allan, Upon the immunising effects of the intracellular contents of the typhoid bacillus as obtained by the disintegration of the organism at the temperature of liquid air. (Proceedings, Royal Society. 12 March. 1903.). — Macfadyens, Allan and Rowland, Sydney, Upon the intracellular constituents of the typhoid bacillus. (Centralbl. f. Bakt. Abt. I. Bd. XXX. 1901. No. 20 und Bd. XXXIV. 1903. No. 7.)

Besredka, Etude sur le bacille typhique et le bacille de la peste. (Annales de l'Institut Pasteur. T. XIX. 1905. Juillet.) — De l'antiendotoxine typhique et des antiendotoxines en général. (Ibid. T. XX. 1906. Février.)

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.